Istituto di Anatomia Patologica dell' Ospedale degl' Incurabili
diretto dal Prof. L. ARMANNI

INFLUENZA

DELLA

INTOSSICAZIONE DIFTERICA

SUI

PROCESSI DI RIPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI CONTINUO

PER IL

Dottor V. MARTINELLI

Chirurgo dell' Ospedale di Loreto

Estratto dal Giornale dell'Associazione dei Medici e Naturalisti
Anno XI — Puntata 4ª

NAPOLI
STAB. TIPO-STEREOTIPO F. DI GENNARO E A. MORANO
S. Sebastiano 48, 1º piano
1901

Istituto di Anatomia Patologica dell' Ospedale degl' Incurabili
diretto dal Prof. L. ARMANNI

INFLUENZA

DELLA

INTOSSICAZIONE DIFTERICA

SUI

PROCESSI DI RIPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI CONTINUO

PER IL

Dottor V. MARTINELLI

Chirurgo dell' Ospedale di Loreto

Estratto dal Giornale dell'Associazione dei Medici e Naturalisti
Anno XI — Puntata 4ª

NAPOLI
STAB. TIPO-STEREOTIPO F. DI GENNARO E A. MORANO
S. Sebastiano 48, 1º piano
1901

Non è raro il caso di osservare come lesioni chirurgiche, le quali sogliono ordinariamente guarire, in alcuni individui invece, assumono un decorso anormale e non mostrano alcuna tendenza a cicatrizzare.

Intendo parlare di lesioni chirurgiche benigne, ed a cui non è mancato ogni opportuno trattamento, ma che non guariscono per un disturbo generale di nutrizione.

Si sa, come le alterazioni della nutrizione generale formano la base di tutte le numerose e svariate forme di cachessia, le quali esercitano un'azione perturbatrice sui processi di riparazione delle soluzioni di continuo modificando la nutrizione e quindi la funzione dei singoli tessuti ed organi.

Questa convinzione finora è stata il prodotto di numerose osservazioni cliniche, ma giammai, per quanto io sappia, si è cercato di darle una dimostrazione scientifica sperimentale.

La letteratura tace al riguardo, se ne togli un pregevole lavoro del Prof. C. Bruni (1), in cui l'autore ha dimostrato il ritardo della formazione del callo osseo negli animali con intossicazione tubercolare e da bacterium-coli; e lo sviluppo

---

(1) La formazione del callo osseo nell' infezione e nell' intossicazione tubercolare (Estratto dal Giornale dell'Ass. dei Medici e Naturalisti Anno VIII, Puntata 4.

di tubercoli, in sito, oltre alla mancata consolidazione delle fratture ossee di animali, in cui si era provocata l'infezione tubercolare sperimentale.

Epperò io ho creduto opportuno, provocando artificialmente un'altra forma di cachessia negli animali, di allargare la cerchia delle indagini, oltre le ossa, agli altri tessuti ed a qualche organo parenchimale.

Bisognava innanzi tutto determinare bene la causa generale debilitante, scegliendo una tossina, che riuscisse efficace e costante nei suoi effetti. Ed a questi requisiti ha corrisposto bene la tossina difterica, di cui descriverò brevemente la speciale preparazione.

Ho cominciato col preparare il brodo nutritivo col 2 0[0 di peptone, secondo la indicazione di Roux, quindi alcalinizzazione del liquido, usando le quantità di soluzioni decinormali di soda, commentate da Martin, in fine sterilizzazione ed inoculazione di una cultura recente di 48 ore di bacilli Löffler.

Questa cultura era molto attiva, giacchè bastava 1[20 di c.c. di essa per ammazzare una cavia del peso di gr. 500 in poco meno di 40 ore. Tenendo il brodo così innestato nella stufa a 37° per sette giorni, si è dipoi filtrato e quindi rimescolato con toluolo puro. Il liquido è stato conservato in bottiglie oscure e sotto uno strato dello stesso toluolo.

Questa tossina, così preparata, era capace di uccidere una cavia del peso di gr. 300 in proporzione di 0,015 in circa 48 ore, con tutti i segni caratteristici della intossicazione acuta difterica, cioè: forte infiltrazione nel punto della inoculazione, lesione delle capsule surrenali, essudazione pleurica a destra, iperemia degli intestini e degli altri organi, flaccidità cardiaca.

In principio, a cultura fresca, le inoculazioni ai conigli, di una dose di 1[10 ad 1[15 di c.c. di tossina riuscivano mortali dopo 36-48 ore; in seguito però questa virulenza è andata man mano diminuendo fino a poter permettere la inoculazione di maggiore quantità ed in varie riprese.

Ma anche in questi casi la sua specifica azione tossica giammai è venuta meno, sia per i segni clinici, che per le alterazioni anatomo-patologiche.

Come è noto, gli animali inoculati con questo veleno, perdono rapidamente di peso, nello stesso tempo che la temperatura si abbassa e si producono disturbi di circolazione e di respirazione.

Le ferite sperimentali, prodotte sugli animali, hanno interessato:

la cute ed il connettivo sottocutaneo
il fegato
le ossa.

Tecnica delle esperienze.

Gli animali prescelti per le esperienze sono stati i conigli, perchè sensibili alla tossina difterica e capaci di tollerare bene le lesioni chirurgiche. Una sola volta ho esperimentato sul cane. I conigli venivano operati quando la cachessia si era ben manifestata, condizione che era determinata dai seguenti sintomi:

Diminuzione del peso
Abbassamento della temperatura
Infiltrazione nel punte della inoculazione della tossina.

È ovvio ricordare che le iniezioni venivano eseguite con le maggiori cautele di asepsi. Costante regione delle inoculazioni, il connettivo sottocutaneo della parete addominale, poichè quivi si poteva ben notare la insorgenza ed il decorso della infiltrazione. Queste iniezioni non si sono praticate nel peritoneo per non avere intossicazioni rapidissime e quindi una condizione incompatibile con il genere delle ricerche che ci proponevamo. Giammai la infiltrazione è apparsa prima delle 24 ore, per lo più verso il secondo giorno. Ordinariamente essa infiltrazione era in continuo aumento nei primi 4-5 giorni, poi restava stazionaria e quindi lentamente si riassorbiva. L' infiltrazione ora si diffondeva a cordone, ora in forma di piastra. Durante i primi

tempi delle esperienze, quando la tossina era ancora di recente preparazione, giammai la suddetta infiltrazione prese notevoli proporzioni, non così nei mesi successivi, quando la infiltrazione giunse a diffondersi a quasi intera la parete addominale, con forte edema periferico.

La dose media iniettata è stata, in generale, di 1|20 di c. c.; il massimo il 1|10, il minimo 1|25.

La dose poi veniva variata secondo il peso del coniglio ed in riguardo all' entità della lesione che si doveva provocare. Così p. es. nelle lesioni cutanee ed ossee si sono iniettate dosi più generose, mentre quando si doveva aprire l' addome per operare sul fegato, era prudenza usare dosi più miti; poichè conigli fortemente intossicati non resistevano a sì grave traumatismo.

In generale una sola iniezione riusciva sufficiente per provocare uno stato cachettico; e quando l'esperimento si prolungava oltre gli 8-10 giorni e l'animale accennava, coll'aumento della temperatura e del peso, a ritornare nelle condizioni normali, se ne faceva una seconda e perfino una terza. Ciò si è praticato nelle fratture ossee.

Questo nostro procedimento era consigliato dall' indole delle nostre ricerche, che, cioè l' animale fosse mantenuto in permanente cachessia.

Credo opportuno ricordare, come per ogni esperimento in coniglio attossicato, paralellamente, v' è stato sempre il controllo in coniglio sano, serbando, per quanto era possibile, condizioni identiche.

Come di sopra ho chiaramente esposto, gli atti operativi sugli animali venivano sempre eseguiti a cachessia confermata.

Le lesioni dei comuni tegumenti comprendevano cute, connettivo, aponevrosi superficiale e frequentemente anche i muscoli. Ora erano delle semplici ferite da taglio, ora sotto forma di perdita di sostanza; seguiva la perfetta emostasia, quindi, la sutura con la seta a punti staccati e la protezione col collodion asettico. La topografia di queste lesioni

è stata varia: dorso, addome, regione interna degli arti. Per le ferite del fegato si eseguiva la laparotomia mediana, si tirava dolcemente il parenchima epatico nella rima della apertura addominale, s' incideva il bordo libero per tutta la sua spessezza, o pure se ne asportava un pezzetto in forma di una linguetta, quindi l' emostasia perfetta, in fine la sutura del viscere e della parete addominale, sempre con la seta a punti staccati, protezione con uno strato di collodion.

Per le fratture ossee, si è operato, ora sugli arti anteriori, ora su quelli posteriori, e sempre sulla diafisi. La maggiore difficoltà della riuscita di questi esperimanti consisteva nel potere adattare un apparecchio che riuscisse realmente immobilizzante senza essere pesante. Per tentativi falliti, abbandonai ogni specie di apparecchio gessato o al silicato, e mi decisi ad adottare l' apparecchio che or ora descriverò e chè riuscì completamente a soddisfare allo scopo immobilizzante: Leggiero strato di cotone idrofilo attorno all'arto — applicazione di due stecche di cartone arrotondate agli estremi e conformate a docce, e anche esse rivestite di un leggiero strato di ovatta. Al disopra giri ripetuti di un nastrino di sparadrappo, quindi involgimento in una lamina di cautchout laminato, per evitare che l' apparecchio venisse macerato dalle urine e dalle fèci dell' animale. In ultimo un altro giro di sparadrappo come sopra.

Questo apparecchio riuniva anche il pregio di essere molto leggiero.

Quando l' esperimento aveva raggiunto il suo fine, i pezzi di tessuti che dovevano essere oggetto di studio venivano escissi subito dopo che l'animale era stato ucciso; poche volte questi pezzi sono stati tolti quando già l'animale era morto spontaneamente.

Le cicatrici cutanee sono state asportate, comprendendo cute, connettivo ed un leggiero strato muscolare; e l'asportazione è stata fatta secondo la loro lunghezza Queste cicatrici venivano distese e fissate con spilli sopra sottili ta-

volette di sughero, per evitare che si arrotolassero. La fissazione è stata fatta nel liquido di Flemming e nella soluzione di sublimato con l'aggiunta di acido acetico (liquido di Carnoy).

Consecutivamente si è eseguito il lavaggio con acqua corrente, passaggio nella serie degli alcool, quindi nel cloroformio; bagno nelle diverse paraffine molli , inclusione in paraffina dura.

I tagli al microtomo, sono stati fatti in serie, nel senso trasversale (cioè perpendicolarmente alla linea della cicatrice), in modo che il punto leso capitando giusto nel mezzo, lasciava studiare bene al microscopio, tanto le alterazioni istologiche del punto leso, quanto quelle dei tessuti vicintori.

Le colorazioni comunemente usate sono state le seguenti *ematossilina*, *carminio alluminato* da solo oppure in unione dello *acido picrico*, *tionina*, *violetto-dalia*, *orceina* (per la ricerca delle fibre elastiche) infine il metodo di Weigert per la ricerca batterica.

Per i pezzi fissati in Flemming la colorazione ordinaria è stata la *safranina* da sola o pure in unione dell' acido picrico; qualche volta si è adoperato ancora il *violetto di genziana* ed il *rosso di Magdala*.

Per le cicatrici del fegato vale quanto si è detto per le cicatrici cutanee, sia per la fissazione dei pezzi che per la colorazione dei tagli.

Per le fratture ossee , si è avuto cura di denudare ben bene i frammenti o il callo da tutti i tessuti molli e quindi si è proceduto alla resezione, un centimetro sotto e sopra della rima di frattura.

Il callo osseo poi si è segato in due metà pressochè uguali, e i pezzi si sono fissati alcuni in una soluzione di acido cromico all'1 %, altri in una soluzione di formalina al 30 %, altri ancora nel liquido di Carnoy.

La decalcificazione si è fatta con una soluzione di acido picro-nitrico. Il lavaggio sotto acqua corrente si è prolun-

gato per varii giorni, come pure il passaggio negli alcool si è ripetuto rinnovando sempre il liquido per liberare completamente l'osso dall'acido picrico.

I tagli si sono fatti nel senso longitudinale, in modo da comprendere la linea di frattura nel mezzo e poter studiare il vario modo di reazione degli strati ossei, partendo dal periostio alla cavità midollare.

Per le colorazioni si sono seguiti i metodi precedentemente indicati :

PARTE I.

Ferite dei comuni tegumenti

Esperienza 1.

Cane (1).

Peso gr. 5250.

Temperatura 39,1.

Iniezione di 1 c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo della parete addominale.

Il giorno seguente il peso discende a gr. 4900 e la temperatura a 37,8. Orina sanguinolenta.

A parte interno della coscia posteriore destra si fa una perdita di sostanza a circa 4 c. m., che viene suturata convenientemente con seta a punti staccati e coverta con collodion. Il tutto con procedimento asettico.

Il giorno appresso il peso scende ancora a gr. 4600 e la temperatura a 37,2.

Al mattino del terzo giorno il cane si trova morto.

La parte operata viene escissa e fissata in formalina.

Esame istologico

Enorme iperemia, che invade tutti gli strati , più specialmente il connettivo sottocutaneo. I vasi, di piccolo ca-

(1) Unico esperimento fatto sopra un cane, essendomi servito, in tutti gli altri esperimenti, sempre di conigli.

libro, sono notevolmente dilatati e riempiti di sangue. Alcuni di essi hanno, alla periferia, dei piccoli infarti, dovuti sia a fenomeni di diapedesi, sia ad effetto di lacerazione.

Tanto allo interno che alla periferia dei vasi, come pure nell'avventizia si notano parecchi leucociti, più numerosi dell'ordinario.

Al livello della soluzione di continuo, i fatti, di sopra rilevati, non subiscono alcuna modificazione.

Tanto l' epitelio che il derma ed il connettivo sottocutaneo appaiono perfettamente separati fra di loro, e nei margini non vi è alcuna infiltrazione parvicellulare, nè lo inizio di qualsiasi principio riparatore.

I preparati tratttati col metodo di WEIGERT per la ricerca batterica, fanno rilevare l' esistenza di un gran numero di *cocchi*, disposti in piccoli ammassi irregolari in numero di 8-10 ognuno. In altri punti sono commisti ad alcuni bacilli tozzi e corti, difficilmente colorabili col metodo di GRAMM.

Ed è degno di nota il fatto, che neanche un così abbondante accumulo batterico è riuscito ad attirare *in loco* un gran numero di leucociti, come suole avvenire nelle ferite suppuranti di animali non intossicati. Questa mancata reazione leucocitaria, malgrado uno stimolo *chemiotattico*, così potente, è, evidentemente, in rapporto al gravissimo stato tossico dell'animale, che produce, nei leucociti, come è stato da molti dimostrato, la quasi completa perdita del loro potere *ameboideo*, e quindi l'impotenza ad accorrere là dove esiste un stimolo flogogeno.

ESPERIENZA 2ª

Coniglio A.

Peso gr. 2047.

Temperatura 39,2.

Iniezione di 1|10 di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo della parete addominale.

Dopo due giorni il peso scende a gr. 1900 e la temperatura a 37,5.

Nel punto delle iniezione si nota una infiltrazione a cordone.

Alla parte interna della coscia destra si fa una ferita da taglio, profonda al connettivo, di circo 4 c. m., che è al solito suturata con seta e protetta con collodion.

Il giorno consecutivo il coniglio si trova moribondo, e il suo peso è ridotto ad appena gr. 1700 e la temperatura a 36,5. Più tardi l'animale muore e la ferita viene escissa e fissata in soluzione di sublimato al 5 $_0/^0$ con l'aggiunta di acido acetico. (liquido di CARNOY).

Esame istologico

Gli strati epiteliali dei margini della ferita hanno subito un fenomeno da molti descritto, cioè una imbibizione sierosa, in modo che tutto lo strato epidermico si mostra notevolmente ispessito, senza più nessuna distinzione dei costituenti le cellule, ed in oltre presenta una colorabilità diffusa ed intensa come suole avvenire generalmente nei primi stadi delle lesioni epitelioli. Anche col metodo di WEIGERT (come questo stesso autore ebbe per primo a notare) il tessuto necrotico imbibito di siero si colora intesamente col violetto di genziana, ed in alcuni punti specialmente superficiali, si mostra costituito come da tanti fasci di fibre disposte alla rinfusa e che sono il prodotto della mutua fusiono delle lamelle epiteliali superficiali commiste evidentemente a numerosi filamenti di fibrina.

Anche quì, col metodo di WEIGERT si notano molti cocchi, meno numerosi però del caso precedente.

Il connettivo che circonda immediatamente i punti, in cui è penetrata la seta della sutura, è alquanto infiltrato di piccole cellule mono e polinucleate. Esse, a distanza dalla lesione, sono ancora abbastanza conservate, ma in

vicinanza di essa, sono disfatte, ed acquistano tutti i caratteri di corpuscoli purulenti.

Il tessuto muscolare sottostante non presenta alcuna reazione sensibile.

ESPERIENZA 3ª

Coniglio B.

Peso gr. 832.

Temperatura 39,1.

Iniezione nel connettivo sottocutaneo dell'addome di $^1/_{20}$ di c. c. di tossina difterica.

Dopo due giorni il peso scende a gr. 750 e la temperatura a 38,0 e nel punto della iniezione si nota una leggiera zona di infiltrazione.

Nei giorni consecutivi le note della cachessia si rendono più evidenti, cioè peso gr. 700 temperatura 37 $^1/_2$.

Perdita di sostanza a parte interna dell' arto posteriore sinistro, al solito, ledente solamente cute e connettivo sottocutaneo, punti di sutura con seta e collodion.

Al terzo giorno muore il coniglio, si escide la cicatrice e si fissa in sublimato ed acido acetico.

Esame istologico

L'epitelio si presenta necrotico non solo nei bordi della ferita ma ancora a distanza, con *ipercromatofilia* diffusa.

Anche qui vi è imbibizione sierosa, la quale, benchè modica, pure si diffonde dagli strati epidermoidali, traverso il derma, fino al connettivo sottocutaneo. E così i fasci connettivali, che sono in vicinanze di quei lesi, appaiono fortemente ispessiti, omogenei e ridotti in zolle ~~tante~~ informi, staccate fra di loro. Sia in questi strati, dove è capitata la lesione, come in quelli circostanti, i vasi sono dilatati. Però, questo fenomeno, certo, non è in rapporto del trauma locale, ma alla dipendenza della intossicazione generale.

Tanto le cellule epiteliali rimaste integre in vicinanza di quelle necrotiche, come le cellule fisse del connettivo, non presentano alcun fenomeno attivo di reazione. E mentre nei preparati di controllo dei conigli non intossicati *le figure cariocinetiche* facilmente si riscontrano, sono rare invece nei conigli attossicati.

I preparati trattati col metodo di WEIGERT lasciano vedere pochi *cocchi*, ed invece gran quantità di *bacterium-coli*; e si gli uni che gli altri fra le rime della perdita di sostanza. Mentre i primi con massima probabilità erano in rapporto alla proliferazione di quelli che si trovano ordinariamente nella spessezza della cute dell'uomo e del coniglio, i secondi invece erano provenienti dalle fecce, che avevano infettata la ferita.

È notevole l' accumulo di corpuscoli di pus negli strati più superficiali della ferita, tale da formare quasi una crosta sottile. Osservando questa più attentamente, risulta formata di uno stroma di filamenti di fibrina, fra le cui maglie si trovano numerosissimi corpuscoli di pus, appena riconoscibili, tanto sono disfatti. Nei punti in cui l' accumulo batterico è maggiore, questi corpuscoli di pus formano una massa finamente granulosa, che rappresenta il prodotto della fusione dei leucociti disfatti. Questa massa si colora intensamente con i colori basici.

ESPERIENZA 4.ª

Coniglio C.

Peso gr. 1280.

Temperatura 39,5.

Iniezione di $^1/_{20}$ di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo addominale.

Dopo due giorni il peso è ridotto a gr. 1050, e la temperatura a 38,2.

Discreta infiltrazione a cordone nel punto della inoculazione.

Dopo altri due giorni, peso diminuito ancora a gr. 9 60, e la temperatura a 37,6; e l'infiltrazione locale è aumentata.

Perdita di sostanza a parte interna dell' arto posteriore destro, sutura, collodion.

Nei giorni consecutivi c'è stata ancora perdita di peso fino a gr. 900, mentre la temperatura si mantiene costante a 37,6

Dopo quattro giorni dalla ferita l'animale viene ucciso ed asportata la cicatrice, di cui parte viene fissata nella solita soluzione di sublimato e acido acetico e parte in liquido di FLAMMING.

Esame istologico.

Lungo i margini della ferita, superficialmente, necrosi completa del tessuto. Un poco più profondamente infiltramento leucocitario e molti granuli liberi di cromatina. Dilatazione vasale, come nel caso precedente, però un poco più accentuata nel punto della perdita di sostanza, rispetto al tessuto circostante. Piccole emorragie, più frequenti al livello della ferita, ma riscontrabili ancora a distanza dalle lesione. Mancata reazione da parte degli elementi fissi del connettivo, fino negli strati più profondi, benchè quivi non sia pervenuto l' infiltramento batterico.

Quindi questa inerzia deve necessariamente mettersi alla dipendenza immediata della intossicazione difterica. Anche quì esiste l'accumulo batterico e quindi la infiltrazione purulenta, però in un modo più superficiale. Benchè i microrganismi non siano pervenuti negli strati profondi, pure la infiltrazione parvicellulare è scarsissima, molto minore di quella che si ha nelle ferite non infette di animali sani.

ESPERIENZA 5.ª

Coniglio D.

Peso gr: 1610.

Temperatura 38,9.

Iniezione di $^1/_{15}$ di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo addominale.

Nei giorni consecutivi il peso scende a gr: 1400 e la temperatura a 39,5, e nel punto della iniezione è rilevabile una diffusa infiltrazione.

In tali condizioni, si eseguono sul dorso del coniglio due incisioni profonde fino ai muscoli e chiuse al solito con punti di suture e protette da collodion.

Nei giorni seguenti alle lesioni tanto il peso che la temperatura si mantengono invariate. Dopo quattro giorni dalle incisioni escido una delle cicatrici. E poichè nei giorni consecutivi le condizioni del coniglio tendono positivamente a migliorare con l'aumento del peso e della temperatura, volendo mantenere l'animale in costante cachessia, procedo ad una seconda inoculazione di tossina difterica e con una dose abbastanza forte, cioè $^1/_{10}$ di c. c. In tal modo subito riappaiono i fenomeni di cachessia.

É degno di menzione, in questo coniglio, che benchè gli si fossero iniettate due dosi di tossina difterica, e la seconda volta in maggiore quantità, pure non è morto come mi è avvenuto con altri conigli precedentemente trattati in tal modo. Credo che tale fatto sia alla dipendenza dello stato più o meno di freschezza della tossina difterica, poichè altri conigli inoculati in questo tempo coll'identiche quantità e spesso più di una volta sono restati in vita.

Altro fatto degno di nota si è il carattere della infiltrazione locale. Questa, nei primi esperimenti, con la tossina di recente preparata, era poco accentuata, mentre negli ultimi tempi si è presentata molto diffusa.

Esame istologico

a) *Cicatrice di quattro giorni*

Notevolissima infiltrazione parvicellulare, accompagnata da invasione batterica.

Questa infiltrazione parvicellulare si diffonde fin negli stati più profondi della lesione di continuo, benchè quivi

non sia pervenuto l' inquinamento batterico. Altri fatti rilevati sono i seguenti: necrosi dell' epitelio, forte imbibizione sierosa, fagccitosi, riassorbimento del tessuto morto nella spessezza del connettivo.

Nei preparati colorati coll'*orceina* appaiono pezzi di fibre elastiche, resistenti ad ogni trasformazione; e si trovano ora in mezzo allo essudato amorfo che congiunge i margini della ferita, ora in mezzo ai corpuscoli di pus che sono molto numerosi alla superficie della cute.

Un poco a distanza da questi margini, si trova un tessuto ben conservato, molto infiltrato di corpuscoli, prevalentemente *mononucleati*, e pochi *polinucleati*.

Essi sono visibili, soprattutto, in vicinanza dei vasi; dove, in qualche punto, incominciano ad acquistare la disposizione che si riscontra nei bottoni carnosi.

Perseverando ancora in una minuta osservazione si nota un fenomeno degno di molto interesse, la proliferazione, cioè, degli elementi fissi del connettivo e specialmente di quelli perivascolari, i quali, in qualche punto, sono così numerosi, da formare quasi dei blocchi, in cui la sostanza intercellulare è ridotta al minimum. Si osservano ancora parecchie *cellule giganti*.

Alla superficie della ferita havvi tessuto necrotico con deposito di fibrina.

In questo esperimento è riuscito notevole il fatto che da parte dei tessuti c' è stato una attività molto cospicua di reazione proliferativa, benchè la cicatrice fosse solo di quattro giorni Ciò non parrà strano quando si ricorderà, che nel momento in cui si escideva la cicatrice, il coniglio, con il peso e la temperatnra, accennava a superare la cachessia e ritornare nelle condizioni normali.

b) *Cicatrice di otto giorni*

I magini della ferita appaiono perfettamente staccati, in modo che fra essi esiste una completa lacuna.

Nessuna rigenerazione epiteliale alla superficie.

Il tessuto connettivale dei margini della ferita non presenta alcuna nota di reazione, ed apparisce così come il connettivo dei punti più lontani; anzi si ha la impressione come, se il numero delle cellule, fra i fasci connettivali, sia notevolmente diminuito, e gli elementi stessi assai più piccoli di quelli delle parti più lontane della ferita.

È notevole la intensa suppurazione diffusa a tutti gli strati fino ad invadere il tessuto muscolare.

In alcuni preparati si nota in vicinanza dei fili della sutura, infiltrazione leucocitaria più o meno intensa, quasi formazione di piccoli ascessi; fatto che si riscontra ancora fra le lacune del connettivo ed anche a distanza dai bordi della soluzione di continuo.

Il tessuto sano che limita quello infiltrato è perfettamente inerte, senza alcuno di quei fenomeni che sogliono rinvenirsi nelle comuni ferite suppuranti.

I fenomeni speciali e gravi riscontrati sui suddescritti preparati trovano la loro spiega nella ripetuta intossicazione del coniglio.

Esperienza 6.ª

Coniglio E.

Peso gr: 1215.

Temperatura 39,1.

Iniezione di $^{1}/_{15}$ di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo addominale.

Dopo due giorni il peso scende a gr: 1100 e la temperatura 38,5. Modica infiltrazione locale.

Dopo altri due giorni, peso diminuito a gr: 950, temperatura abbassata a 37.8, aumentata l'infiltrazione locale.

Si esegue una incisione di un 3 c. m. sulla parete addominale, comprendendo al solita cute e connettivo, punti di sutura e collodion.

Nei giorni consecutivi il coniglio subisce minime oscillazioni di peso e di temperatura fino alla fine della seconda

settimana, in cui l' animale accenna con il miglioramento nutritivo generale, a voler superare lo stato cachettico.

Al quindicesimo giorno preciso il coniglio viene ucciso, la cicatrice è asportata, di essa parte vien fissata in soluzione di sublimato ed acido acetico e parte in liquido di Flemming.

Esame istologico

Anche quì l' epitelio non è per nulla saldato, ed ai margini della ferita si notano pezzi necrotici di esso epitelio. Però, a differenza di quanto si è veduto precedentemente, non vi ha quì una infiltrazione purulenta molto accentuata sia nei tessuti epiteliali che negli strati più profondi.

Scarsa appare la infiltrazione parvicellulare, come del pari è minima ogni reazione da parte degli elementi fissi del connettivo.

Solo nel fondo della ferita, al livello del connettivo sottocutaneo, si hanno fatti più cospicui di reazione organizzante. Infatti l'osservazione fu rilevare dilatazione vasale, ed aumento dei piccoli vasellini, i quali sono circondati da una infiltrazione parvicellulare mono e polinucleare.

E dal fondo della ferita che appare iniziata la genesi di buone granulazioni, le quali però non hanno raggiunto il livello degli strati superficiali, per cui non è stato possibile all'epitelio di potersi avanzare e farne il rivestimento.

PARTE II.

Ferite del fegato.

Esperienza 1.ª

Coniglio A.

Peso gr. 971.

Iniezioue di $^1/_{25}$ di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo addominale.

Dopo due giorni il peso è ridotto a gr: 900 e la temperatura a 38,0. Discreta infiltrazione nel punto della iniezione.

Laparatomia mediana, scoprimento del fegato, che dolcemente viene tirato fra le labbra della ferita addominale; taglio completo della spessezza del bordo libero del fegato per un paio di c. m.; emostasia accurata, due punti di sutura; affondamento dell'organo nella cavità addominale, sutura delle pareti.

Neì gioni consecutivi il peso scende ancora di altri 50 gr: mentre la temperatura resta quasi stazionaria.

All'ottavo giorno dalla operazione viene ucciso l'animale e tolta la cicatrice del fegato, che viene fissata parte in soluzione di sublimato e acido acetico e parte nel liquido di Flemming.

Esame istologico

Tutta la massa del tessuto epatico, compresa nei limiti dei punti di sutura appare completamente necrotica. Infatti per una larga zona, visibile, in alcuni punti, anche ad occhio nudo, si ha un completo scoloramento del tessuto, nè si riconosce alcuna struttura nei suoi elementi. Solo qua e là rimangono colorati pochi nuclei, ma di una tinta molto pallida. Si ha anzi spesso l'impressione che lo scheletro nucleare sia rimasto *in loco*; e che, invece i succhi organici abbiano trasportato via la sostanza cromatica.

Attorno a questo tessuto necrotico, si nota come un cercine, nei cui strati più esterni, vi ha un' ammasso enorme di corpuscoli purulenti, in gran parte disfatti, ed in alcuni punti fusi fra loro, in modo da formare quasi uua massa omogenea intensamente colorabile.

In questa sede non si riscontrano microrganismi: i quali, invece si accumulano nelle parti superficiali del tessuto necrotico, dove vi ha mancanza di infiltrazione parvi-cellulare, e si arrestano quasi completamente nella linea di divisione fra zona necrotica e zona infiltrata.

Pare quasi che il pus formi una barriera notevole, perchè

non avvenga l' ulteriore progresso dei microrganismi negli strati più profondi.

Ciò appare tanto più evidente, in quantochè allo esterno di questa infiltrazione purulenta , si nota un' attiva organizzazione connettivale la quale non viene disturbata da alcun elemento estraneo.

Ed invero si vede come un' anello continuo di tessuto giovane fibrillare, ricchissimo di cellule, di cui già alcune fusiformi, veri *fibroblasti* , i quali si dispongono circolarmente cosi come i fasci fibrillari.

In qualche punto si nota pure la formazione , il modo circoscritto, di un tessuto a cellule raggiate, il quale tessuto, per i suoi caratteri istologici e cromatici , si assomiglia ad un tessuto mucoso.

Questo tessuto connettivo è vivamente iperemico, con numerosi piccoli vasi, prevalentemente capillari , disposti in tutta le direzioni , e specialmente nelle zone periferiche presso il tessuto sano.

Sono visibili pure numerosi canalicoli biliari con epitelio ben colorabile, i quali però sono disposti, in maggior numero nella zona più vicina al tessuto morto. Anzi in qualche punto si vedono le cellule epatiche periferiche subire un processo di iperfunzione e trasformarsi in vere *cellule giganti epiteliali allungate polinucleate* che ora sorgono per in grandimento di una sola cellula epatica, ora provengono dalla fusione di parecchie di questi elementi.

In mezzo al tessuto connettivo risiduano ancora cellule epatiche isolate , atrofiche , altre cariche di pigmento , ed altre infine degenerate in grasso.

Si notano ancora qua e là granuli di pigmento ematico rossobrunastro , ora liberi , ora inglobati in grosse cellule polinucleate.

Infine, al di fuori di questo tessuto connettivo si vede il tessuto epatico, quello cioè non compreso nella satura, con rigonfiamento torbido accentuato dei suoi elementi epitetali e con iperemia dei vasi inter ed intra acinosi.

ESPERIENZA 2.ª

Coniglio A.

Peso gr. 1,400.

Temperatura 39,0.

Iniezione di $^1/_{20}$ di c. c. di tossina difterica nel connettivo sottocutaneo addominale.

Nei giorni consecutivi il peso dell'animale diminuisce di circa 200 gr. e la temperatura scende a 38.

L'infiltrazione locale è abbastanza accentuata e diffusa.

Poichè questo stato di media intossicazione si mantiene invariato, procedo senz'altro alla laparatomia mediana dell'animale ed opero sul fegato come nel caso precedente.

Nei primi giorni dopo l'atto operativa, il peso diminuisce ancora di altri 100 gr. mentre la temperatura risale a 38,5; però in seguito le condizioni di nutrizione del coniglio migliorano tanto che il peso raggiunge i gr. 1300. Queste condizioni si mantengono invariate fino al quindicesimo giorno in cui l'animale viene ucciso, e la cicatrice del fegato viene scissa è fissata in soluzione di sublimato e acido acetico liquido di CARNOY e liquido di FLEMMING.

Esame istologico

Lo studio dei preparati di questa cicatrice di quindici giorni mostra in generale l'evoluzione della lesione più progredita. Infatti il tessuto connettivo ha qui un maggiore spessore, quasi il doppio di quello precedente ; ed è molto più ricco di cellule fusiformi , mentre è minore il numero dei vasi sanguigni.

L'infiltrazione purulenta è abbondantissima ed ha sede sul tessuto necrotico che appare disfatto ed è riconoscibile nei suoi elementi.

La zona centrale del tessuto necrotico è priva d'infiltrazione, e lascia abbastanza vedere l'aspetto e la topografia

delle trabecole epatiche ; però i nuclei sono sprovvisti di potenzialità colorante.

È notevole pure la presenza in molti punti di grosse e numerose *cellule giganti*.

Oltre i confini della cicatrice si nota forte degenerazione adiposa delle cellule epatiche.

PARTE III

Fratture ossee

Esperienza 1.ª

Coniglio A.

Peso gr. 1137.

Temperatura 38,9.

Iniezione, nel connettivo sottocutaneo addominale di $^1/_{15}$ di c. c. di tossina difterica.

Nei giorni consecutivi perdita di peso di gr. 250 e scesa della temperatura a 37,2.

In tali condizioni viene praticata una frattura sulla diafisi dell'arto anteriore destro, applicato un apparecchio immobilizzante.

Al quarto giorno il coniglio si trova morto.

Naturalmente le ossa fratturate sono completamente libere e mobili senza alcuna coesione.

I tessuti molli sono edematosi e vengono scollati completamente dalle ossa fratturate, le quali si fissano in sublimato e vengono decalcificate in una soluzione di acido picro-nitrico.

Esame istologico

Lieve infiltrazione parvicellulare, con modica iperemia dei tessuti vicini. L'osso mostra ai suoi due estremi, in molti punti, la morte già dei suoi elementi, che sono poco colorabili e poco visibili.

Nè nella rima della frattura è avvenuto un forte versamento sanguigno, nè si scorge una reazione infiammatoria e manca quindi ogni formazione di tessuto. Solo in qualche punto, e proprio in vicinanza della parte periferica periostale, si vede qualche sottile zona di tessuto connettivo, che comincia a subire la trasformazione cartilaginea; senza però che la formazione di quest'ultimo tessuto sia completa. Anche da parte del midollo non si hanno modificazioni di rilievo, salvo una leggiera emorragia.

Con i metodi per la indagine batterioscopica, non si è avuto alcun risultato positivo, ciò che dimostra, come nel focolaio di frattura non sono pervenuti batterii di alcuna natura.

Esperienza 2.ª

Coniglio B.

Peso gr. 1600.

Temperatura 39,2.

Iniezione nel connettivo sottocutaneo addominale di $^1/_{20}$ di c. c. di tossina difterica.

Dopo due giorni dalla iniezione appaiono i primi sintomi della cachessia, caratterizzati dalla perdita del peso e dall'abbassamento della temperatura.

Si produce una frattura lungo la diafisi dell' arto anteriore sinistro, ove si applica un'apparecchio immobilizzante. Per altri giorni ancora si mantengono la diminuzione del peso (gr. 1300) e della temperatura; (37,4) ma verso l'ottavo giorno dall'avvenuta frattura il coniglio comincia a superare la cachessia con l'aumonto del peso e della temperatura, per cui credo opportuno di fare una seconda iniezione di tossina ed in maggiore quantità ($^1/_{10}$ di c. c.). E ciò allo scopo di mantenere permanente la cachessia durante il processo di riparazione.

Infatti dopo questa seconda iniezione il deperimento del coniglio va man mano progredendo fino a perdere un terzo del suo peso e la temperatura riducesi a 36,6.

La morte avviene al dodicesimo giorno dall' avvenuta frattura.

Esame istologico

Colpisce il fatto che mentre le estremità ossee sono in porfetto combaciamento (risultato questo certo ottenuto dall'apparecchio bene immobilizzante) pure i suddetti estremi mostrano poca tendenza alla fusione ; nel senso che pure essendovi tessuto cartilagineo abbastanza sviluppato , esso proviene quasi esclusivamente dal periostio, senza che nè l'osso nè la midolla vi piglino alcuna parte. Questo tessuto cartilagineo lo si può seguire gradualmente nel suo sviluppo, e vedere come il connettivo si trasforma in tessuto di cartilagine.

Questa però non è perfettamente tipica, mancando cioè la caratteristica disposizione a colonne , che suole riscontrarsi nella cartilagine proliferante normale. Si osservano quà e là fenomeni di *cariocinesi,* di forma però non perfettamente tipica.

Si può seguire ancora la trasformazione di questa cartilagine in tessuto osseo ; ma la zona della cartilagine a sostanza intercellulare ipercolorabile, è abbastanza ineguale e manca anzi completamente in alcuni punti. Infine gli spazii midollari primitivi , con il loro rivestimento osteoblastico, sono frequenti, irregolari e con una relativa abbondanza di tessuto osteoide, a sostanza intercellulare granulosa rispetto al tessuto osseo vero. In generale prevale lo sviluppo e l'estensione della cartilagine rispetto all'osso neoformato, mentre nei preparati di controllo questo divario non esiste. Colpice inoltre il fatto che la neoformazione comincia dal periostio ed a notevole distanza dalla rima di frattura, mentre per un buon tratto, tutti i tessuti ossei in vicinanza della perdita di sostanza restano quasi del tutto inerti, senza alcuna tendenza a proliferare.

ESPERIENZA 3.ª

Coniglio C.

Peso gr. 1800.

Temperatura = 39,2.

Iniezione al connettivo sottocutaneo addominale di $^1/_{20}$ di c. c. di tossina difterica.

Dopo due giorni il peso è di gr. 1700 e la temperatura 38,3.

Al quarto giorno il peso scende ancora a gr. 1600 e la temperatura a 38,0. In queste condizioni provoco una frattura all'arto anteriore e vi applico il solito apparecchio immobilizzante.

Poichè nei giorni consecutivi al trauma sia il peso che la temperatura accennano ad un progressivo aumento, così si fa la seconda iniezione di tossina difterica (sempre nel connettivo sottocutaneo addominale) alla dose di $^1/_{20}$ di c.c.

In seguito a questa seconda iniezione si ripetono i fenomeni precedenti di cachessia, che svolgono tutto il ciclo di peggioramento e quindi di miglioramento in circa otto giorni.

Volendo però mantenere il coniglio sempre sotto l' influenza tossica si esegue una terza iniezione di tossina difterica nella quantità di $^1/_8$ di c. c.

Nei giorni seguenti appaiono i fatti di deperimento dell' animale e quindi la diminuzione del peso e l' abbassamento della temperatura.

Il coniglio viene ucciso al 20° giorno dalla sua frattura.

Si asporta il callo osseo che è molto esuberante e viene fissato in acido cromico all'uno per cento.

Esame istologico

Estensione molto grande del tessuto cartilagineo che invade tutti i tessuti che circondano l'osso. Si può anche notare come in qualche punto anche i muscoli sono invasi, formando il tessuto cartilagineo come tante ghiere attorno ad

esso. Questo tessuto cartilagineo però, malgrado il suo enorme sviluppo, anche quì non è perfettamente normale e non presenta così numerose figure cariocinetiche come nei preparati di controllo.

La sostanza ossea appare già abbastanza sviluppata a spese del tessuto cartilagineo; ma essa è sempre di molto inferiore a quella che dovrebbe essere in tale epoca di evoluzione.

Inoltre questo tessuto osseo neoformato è enormemente spongioso più di quello che dovrebbe essere in condizioni normali.

Non presenta però caratteri speciali, sia per la disposizione degli *osteoblasti*, sia per la formazione midollare, sia infine per la disposizione dei vasi. É notevole ancora il gran numero degli *osteoclasti* e delle relative lacune di Howship, che si trovano tanto al livello dell'osso vecchio che non ha preso parte alla neoformazione e che è destinato ad essere riassorbito, quanto in vicinanza dell'osso neoformato.

Gli *osteoclasti* sono in questo sito più numerosi del normale e alcuni di essi assumono delle dimensioni veramente notevoli.

Anche quì la ricerca batterica col metodo di Weigert, è riuscita completamente negativa.

CONSIDERAZIONI GENERALI E CONCLUSIONI

Primo fatto assodato: la intossicazione difterica produce una *vera e propria cachessia*, provocando disturbi generali di nutrizione. Infatti in tutti i conigli inoculati, con la suddetta tossina noi abbiamo ottenuto diminuzione di peso e abbassamento di temperatura.

Prima di queste esperienze molti autori non ammettevano che questa tossina fosse ~~stata~~ capace di produrre disturbi generali prolungati; ma invece fenomeni rapidi e mortali, e quando gli animali sopravvivevano solo fenomeni nervosi paretici.

Altro carattere importante riscontrato in tutte le lesioni dei conigli attossicati è stato: *il ritardo del processo di rigenerazione.* Questo ritardo è stato più o meno notevole secondo il grado della intossicazione e la varietà del tessuto. Maggiore soprattutto nelle cicatrici cutanee, nelle quali arriva fin quasi a mancare ogni attività reattiva da parte degli elementi istologici. Nelle lesioni epatiche invece è avvenuto un processo piuttosto rigoglioso da parte del connettivo, mentre gli elementi parenchimali hanno mostrato chiaramente processi regressivi e necrotici diffusi. Queste alterazioni non si sono riscontrate negli animali di controllo, dove piccoli focolai necrotici erano solamente esistenti e limitati dai fili della sutura.

Certo questo maggiore progresso nella formazione della cicatrice è stato favorito dalla più leggiera intossicazione prodotta in questi animali.

Grande ritardo ancora si è avuto nella formazione del

callo osseo, dove si può dire che ogni attività formativa si è arrestata allo stadio cartilagineo. Questi risultati sono in relazione delle ripetute intossicazioni prodotte negli animali fratturati.

Eppoi bisogna considerare che la formazione del callo osseo è un processo così multiforme e complesso, che si richiede la maggiore attività da parte degli elementi che concorrano a costituirlo. Ora, la intossicazione difterica altera abbastanza profondamente la nutrizione generale e quella dei singoli tessuti. Al riguardo ancora di questo argomento debbo far notare che la tossina difterica, a differenza di altre tossine, le quali, a dosi refratte riescono eccitanti per la proliferazione ossea essa invece, anche a dosi minime giammai ha prodotto acceleramento nella generazione del callo.

Terzo fenomeno, degno di nota, la presenza di numerose *cellule giganti.*

Si sa come l'apparizione di queste cellule è alla dipendenza di quegli stati morbosi in cui vi è grave deperimento generale. Esse rappresentano uno imperfetto processo di divisione e moltiplicazione cellulare e ci dimostrano chiaramente la insufficienza organica dei tessuti ad una attività rigenetratrice.

Non deve meravigliare quindi la diminuzione delle figure *cariocinetiche* ; e di esse, buona parte appartiene a quelle cosidette *mitosi atipiche* o *patologiche.*

Debbo quì anche ricordare come nella deficiente o mancata rigenerazione dei tessuti nelle lesioni cutanee, i *corpuscoli mobili* si sono addimostrati più resistenti per una maggiore attività reattiva, mentre minima o negativa è stata la proliferazione da parte delle *cellule fisse* del connettivo e da parte degli elementi vasali. Così pure gli *elementi epiteliati* non hanno mostrato alcuna attività riparatrice (mancanza dell'epitelio cutaneo di rivestimento nelle lesioni della pelle); invece una spiccata alterazione regressiva (cellule parenchimali del fegato).

Infine l'altro fenomeno importante occorso nelle lesioni dei conigli attossicati è stata la *infezione batterica* mentre nei conigli di controllo essa è stata negativa. Eppure in tutti gli esperimenti si è usata sempre la identica e scrupolosa pratica asettica. Questa presenza dei batterii però è mancata solo nella formazione del callo osseo dei conigli attossicati.

Questo diverso modo di comportarsi del tessuto di riparazione di fronte ai batterii si può spiegare, ricordando i risultati delle esperienze dell'ADAMKIEVICZ sul potere protettore del tessuto granulatore.

Ora devesi ragionevolmente supporre, che negli animali attossicati, mancando ogni formazione di buona granulazione, è venuta a mancare la più solida barriera di difesa alla invasione batterica. Come pure, la diminuita attività e resistenza dei leucociti, per l'alterata nutrizione generale, ha favorito la moltiplicazione di essi batterii e quindi le estese infiltrazioni e la formazione di ascessi. I batterii ordinariamente riscontrati, sono stati gli *stafilococchi*; altre volte il *bacterium-coli*.

Concludendo, per quanto logicamente si potesse prevedere, come una intossicazione, provocando un'alterazione nutritiva generale, dovesse, per conseguenza, produrre un perturbamento dei processo nutritivo e formativo del tessuto riparatore delle ferite, pur nondimeno attesa l'indole dimostrativa dei moderni studii medici, era necessario potere ciò dimostrare per mezzo degli esperimenti.

I risultati ottenuti da essi, non mi autorizzano a conclusioni d'indole generale; che cioè ogni specie di intossicazione viene a menomare i processi di rigenerazione delle lesioni di continuo. Riserbiamo questo compito a quelli che ripeteranno ed allargheranno questa specie di indagini.

A me basta annunziare i risultati ottenuti dalle mie esperienze che cioè la *intossicazione difterica* adoperata nelle dosi e con i metodi da me seguiti *è capace d'indurre un*

ritardo ed un perturbamento nel processo di riparazione delle perdite dì sostanza, sia nei tessuti che negli organi.

Ed ora, giunto alla fine di questo lavoro, con animo riconoscente ringrazio l'Illustre Prof. L. Armanni dell'illuminato consiglio, di cui sempre mi è stato largo durante il corso delle mie esperienze.

Napoli, Settembre 1901.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Fig. I. — Cute di coniglio intossicato. (cicatrice di 8 giorni).

1. Epitelio nel punto ove comincia a disfarsi.
2. Infiltrazione parvicellulare.
3. Connettivo imbibito di siero.

Fig. II. — Cute id. a più forte ingrandimento.

1. Accumulo di emasie nelle maglie del connettivo.
2. Infiltrazione leucocitaria.
3. Imbizione sierosa del connettivo.

Fig. III — Fegato sano operato.

1. Zona centrale necrotica a livello dei fili di sutura.
2. Connettivo neoformato ricco di vasi sanguigni e di qualche vase biliare.
3. Tessuto epatico sano.

Fig. IV. — Fegato di coniglio intossicato ed operato.

1. Tessuto epatico necrotico.
2. Connettivo neoformato.
3. Cellule giganti provenienti dalla proliferazione dei tubuli biliari. - le cellule giganti con vacuoli centrali -

Fig. V. — Collo osseo normale di 12 giorni.

1. Pericondrio.
2. Residui cartilaginei.
3. Spazii midollari primitivi già circondati da tessuto osseo neormato.

Fig. VI. — Callo osseo di animale intossicato dopo 12 giorni.

1. Pericondrio.
2. Connettivo.
3. Cartilagine ancora in predominio.
4. Spazii midollari, dei quali è appena iniziata la formazione.

Fig. VII. — Callo osseo di coniglio intossicato di 20 giorni.

1. Poche cellule cartilaginee residuali.
2. Tessuto osseo.
3. Numerosi osteoclasti e relative lacune di Howship.

Fig. I.
Leitz-oc.2-ob.3

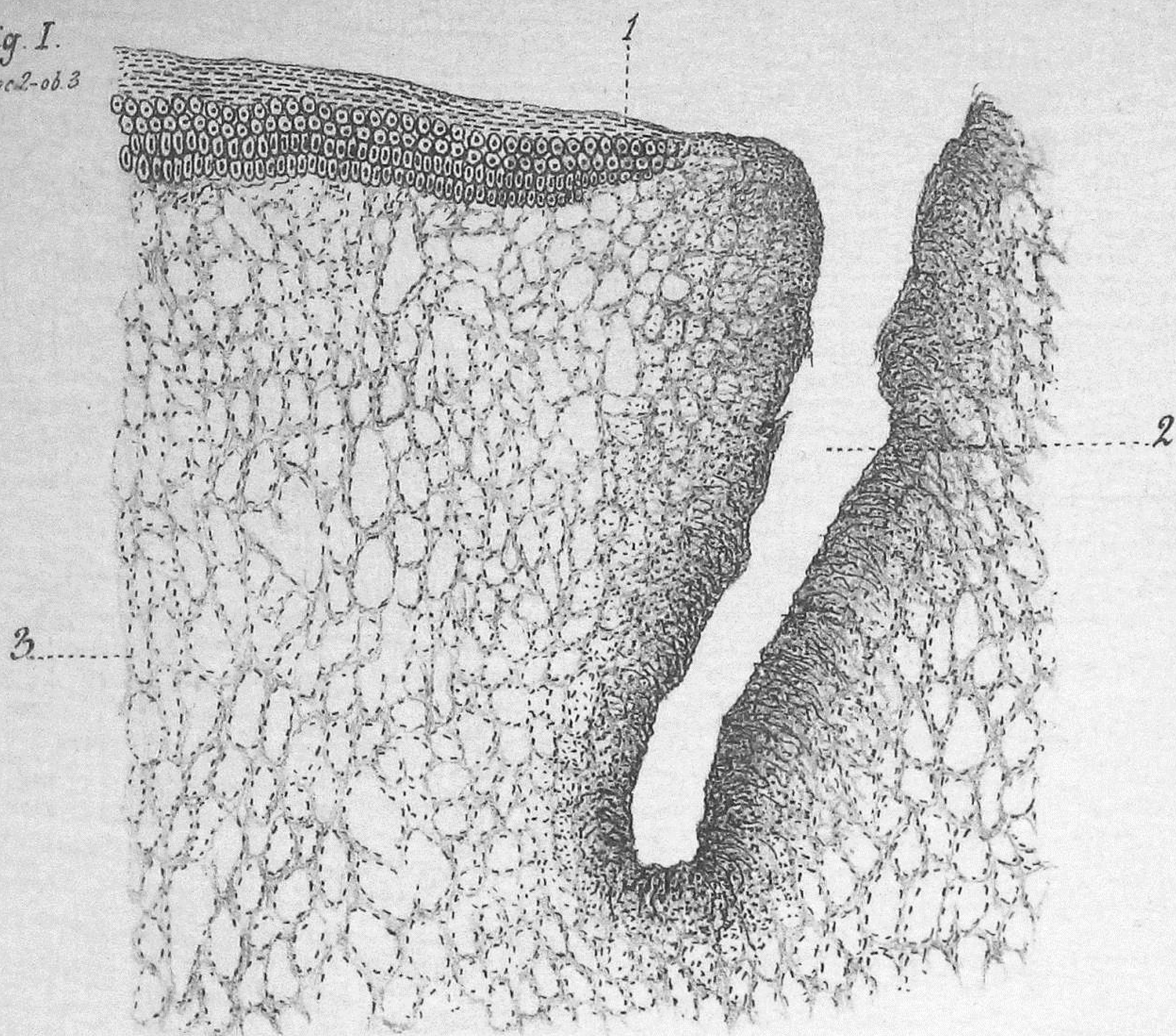
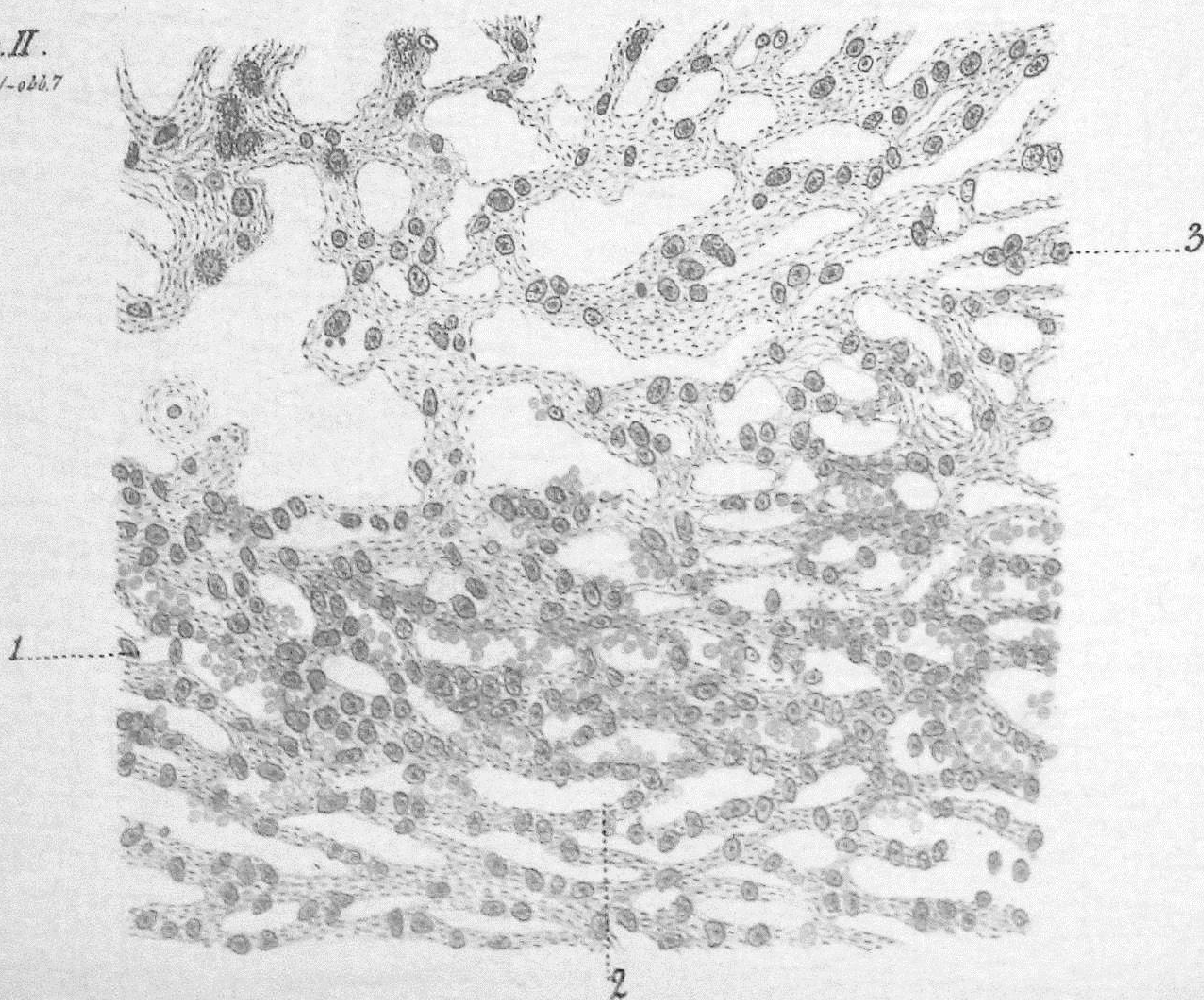


Fig. II.
Leitz-oc.1-obb.7



C. Amati dis.

lit. A. Serino-Napoli

Fig. III.

Hart. oc. 2 - obb. 1.

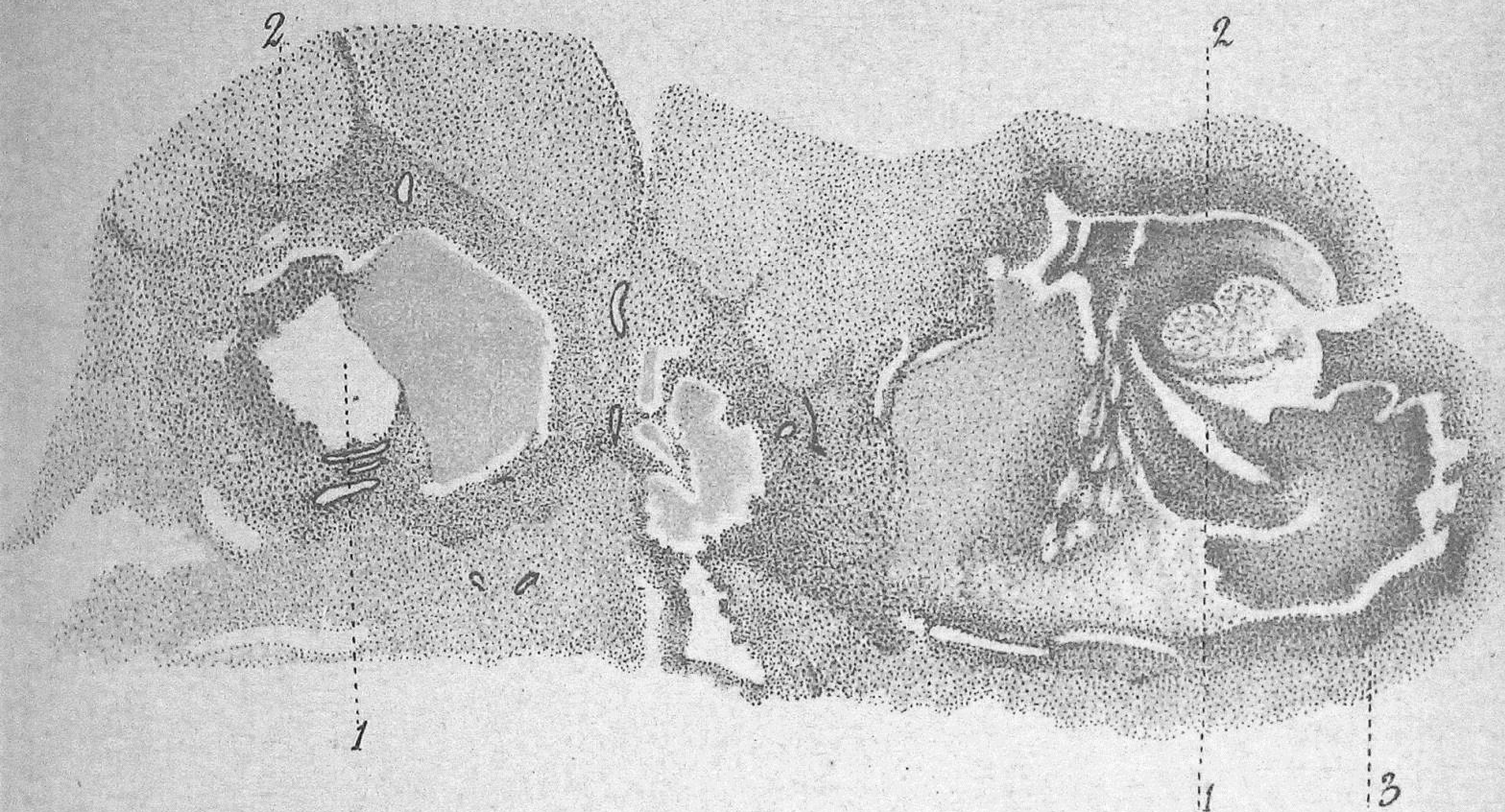


Fig. IV.

3

2

1

4

4

3

C. Amati dis.

lit. A. Scrino-Napoli

Fig. V.
Leitz oc. 3-obb. 3

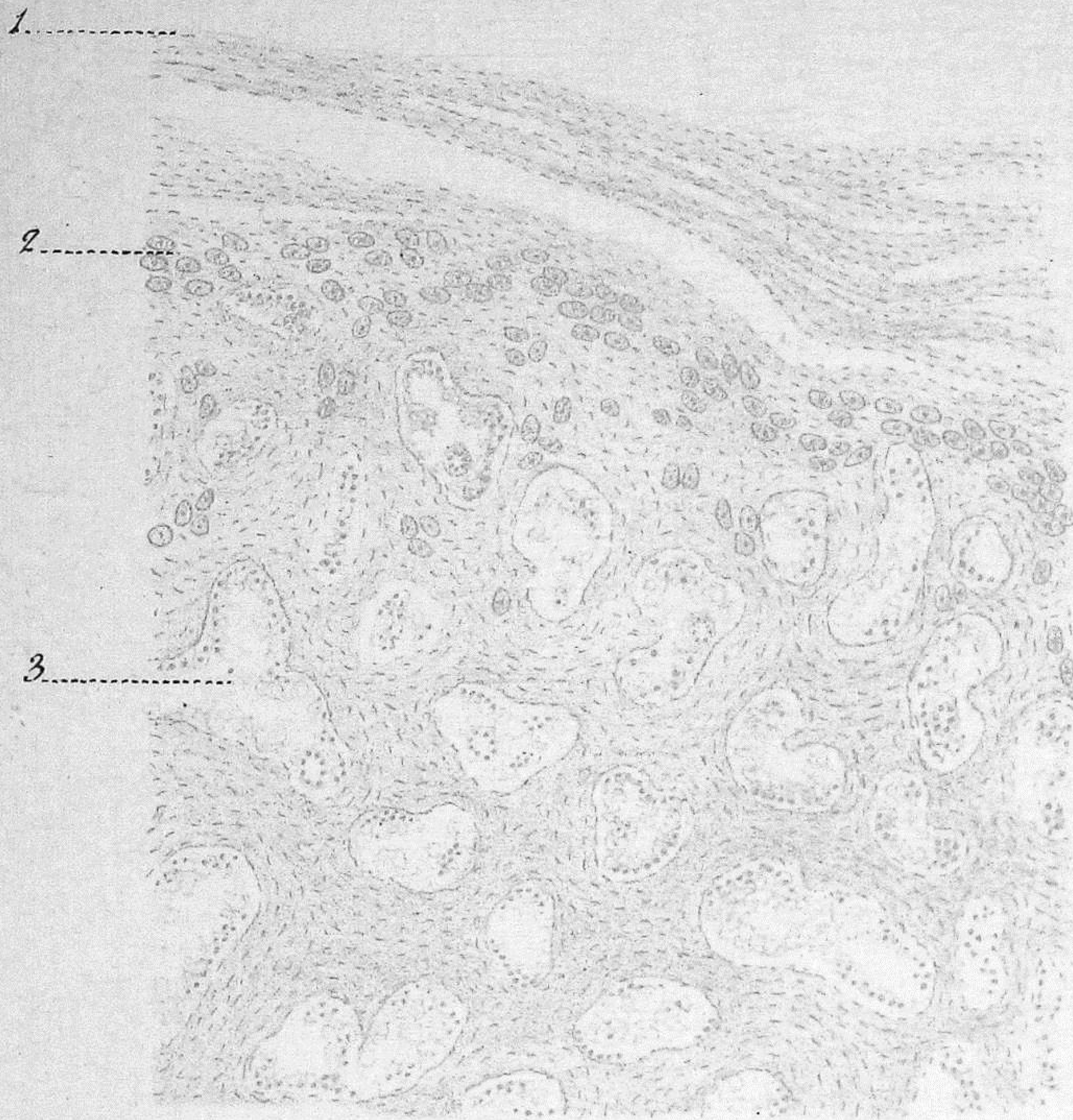
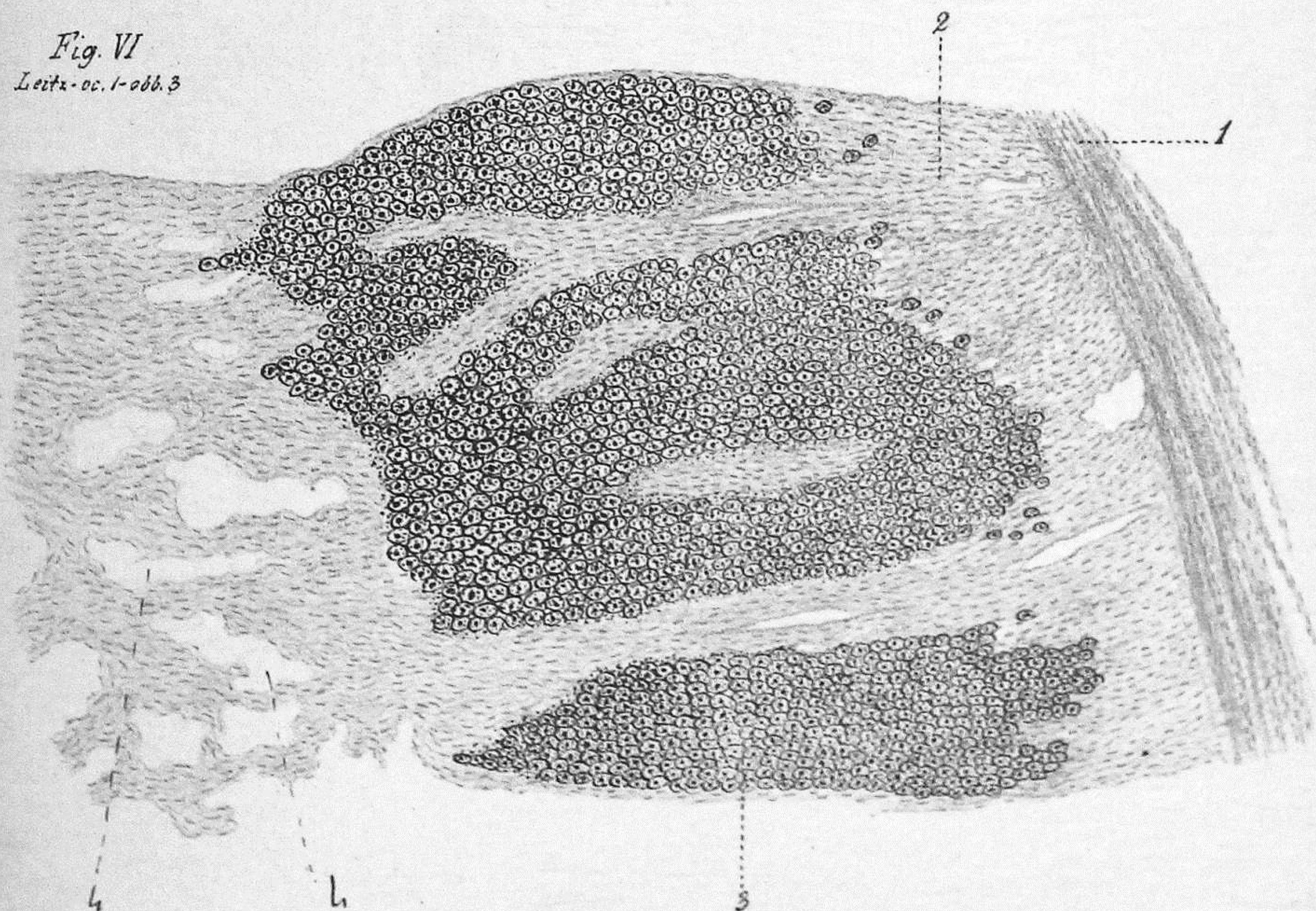
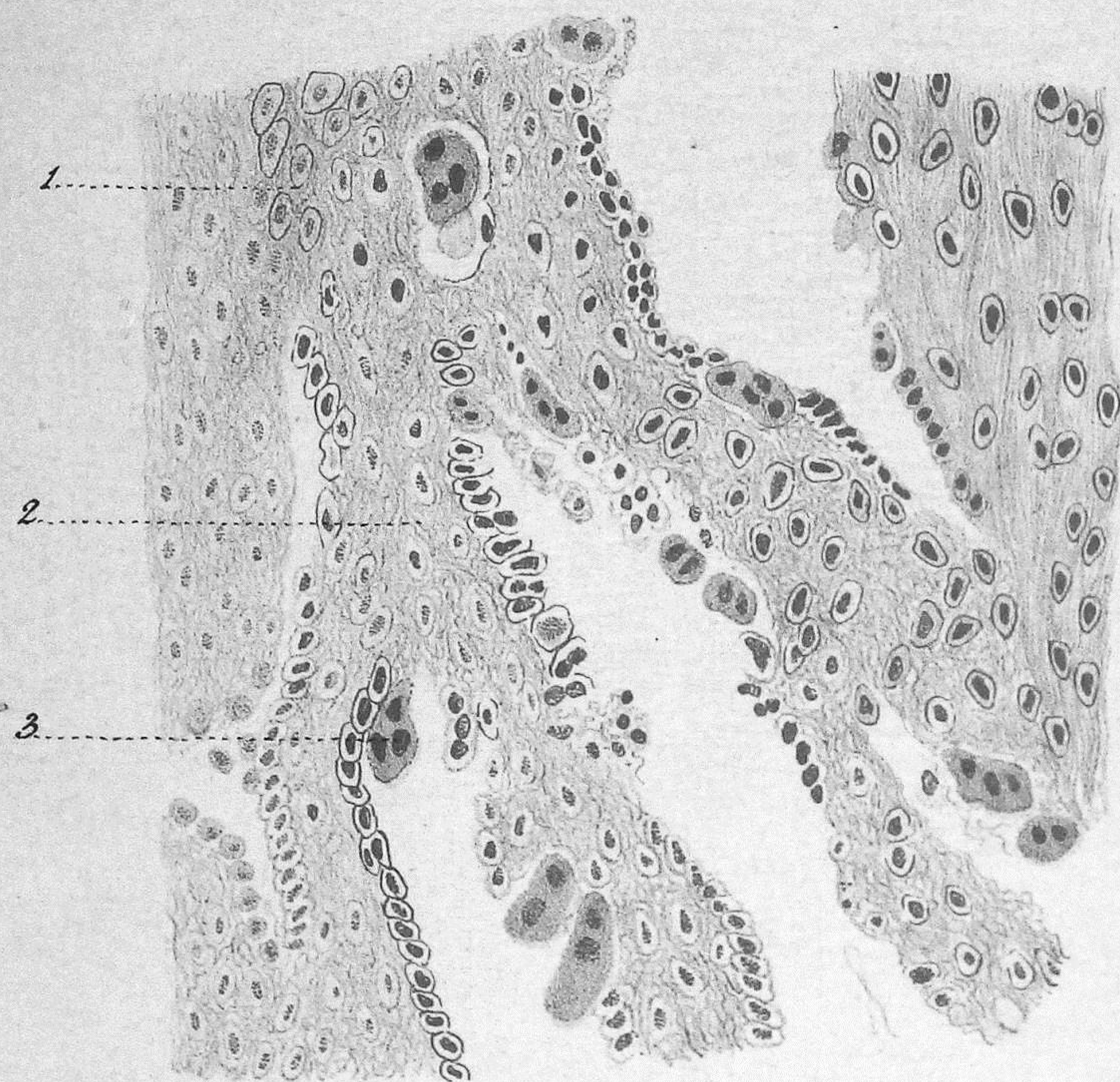


Fig. VI
Leitz-oc. 1-obb. 3



C. Amati dis.   A. Serino-Napoli

Fig. VII
Leitz. oc. 1 - obb. 7



C. Amati dis.

A. Serino-Napoli